

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-091494

(43)Date of publication of application : 06.04.2001

(51)Int.Cl.

G01N 27/416

(21)Application number : 11-270871

(71)Applicant : TOSHIBA CORP

(22)Date of filing : 24.09.1999

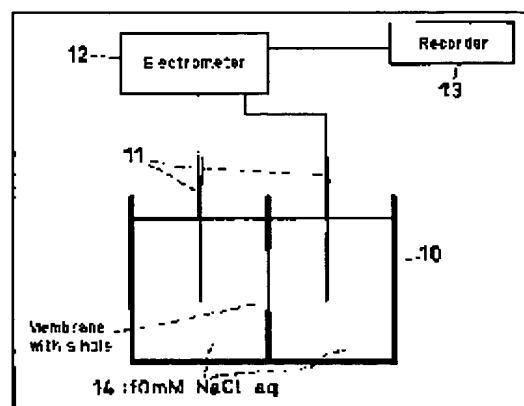
(72)Inventor : ISHIMORI YOSHIO

(54) SENSOR DEVICE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a maintenance-free poison sensor capable of determining the type and the quantity of poison at real time.

SOLUTION: This poison biosensor using a lipid bilayer 2 is so formed that lipid solution fills a hole detecting the destruction of the bilayer and automatically forming a lipid bilayer.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

08.03.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-91494

(P2001-91494A)

(43) 公開日 平成13年4月6日(2001.4.6)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 27/416

識別記号

F I

G 0 1 N 27/46

テ-マコ-ト*(参考)

3 4 1 M

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平11-270871

(22) 出願日 平成11年9月24日(1999.9.24)

(71) 出願人 000003078

株式会社京芝

神奈川県川崎市幸区堀川町72番地

(72) 発明者 石森 義雄

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株式会社京芝研究開発センター内

(74) 代理人 100081732

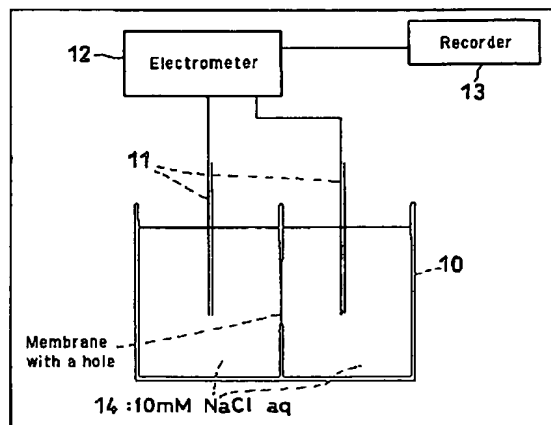
弁理士 大胡 典夫 (外1名)

(54) 【発明の名称】 センサデバイス

(57) 【要約】

【課題】 メンテナンスフリーで、かつリアルタイムで毒物の種類と量を決定できる毒物センサを提供する。

【解決手段】 脂質二分子膜2を用いる毒物バイオセンサにおいて、膜の破壊を検知して自動的に脂質膜を作製する穴に脂質溶液を注入するデバイス。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 毒物が作用できる脂質二分子膜を具備する毒物センサにおいて、脂質二分子膜の破壊を自動的に検知して、自動的に基板の穴内部に脂質膜を形成させることを特徴とするセンサデバイス。

【請求項2】 前記毒物センサは、前記脂質溶液を貯留する容器、脂質溶液を吐出する機構、基板の穴に脂質溶液を導入する機構及び脂質二分子膜の破壊を検知する機構からなることを特徴とする請求項1記載のセンサデバイス。

【請求項3】 前記脂質溶液を吐出する機構に、脂質二分子膜破壊の信号を検知して自動的に動作する機構を連携させることを特徴とする請求項2記載のセンサデバイス。

【請求項4】 前記吐出機構としてポンプあるいはインクジェット方式を適用することを特徴とする請求項3記載のセンサデバイス。

【請求項5】 前記検出信号として、膜電位変化を用いることを特徴とする請求項3記載のセンサデバイス。

【請求項6】 前記異なる組成の脂質二分子膜から構成されるセンサ単体を複数種類用いることを特徴とする請求項1記載のセンサデバイス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中に存在する毒物を測定するためのセンサデバイスに関する。

【0002】

【従来の技術】今日我々を取り巻く環境には、生体に有害である物質（広義の毒物）が多数存在している。例えば、水道水中のトリハロメタンや大気中のダイオキシンなどが念頭に浮かぶが、その他にも例数こそ少ないが、シアンやカドミウムと言ったいわゆる毒物による水道原水や地下水の汚染も時たま新聞誌上を賑わしている。ところで、こうした毒物の検出はどのようにして行われているのだろうか。浄水場での検査は、水道原水を流し入れた水槽で魚を飼い、この魚の動きを画像解析して、異常行動を取った時に毒物の混入を検知するシステムを用いるものが多い。あるいは、富士電機が開発した、硝化細菌を利用する毒物センサもある。これは、水道原水中に硝化細菌の餌であるアンモニアを一定量添加した後、硝化細菌を電極表面に固定化した酸素センサと接触させ、硝化細菌の活性度を溶存酸素濃度の減少量から見積もり、活性度の低下により毒物混入を判定するものである。ところがこれらの方法では、ほぼリアルタイムで毒物の検出ができる反面、餌を与えるなどのメンテナンスが必要であり、かつ毒物の種類や量を決定することは困難であった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前記問題点を解決するためになされたものであり、メンテナンスフ

リーで、かつリアルタイムで高感度に毒物の種類と量を決定することを可能にするものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、メンテナンスフリーで、かつリアルタイムで毒物の種類と量を決定することを可能にするセンサデバイスに関する。

【0005】ここではまず、毒物の作用から考えてみたい。毒物とは、生体に害を及ぼす物質のことであるが、突き詰めて考えると生体「細胞」に害を及ぼす物質であると言い換えることもできる。従って毒物の作用も、

「細胞膜」に何らかの影響を及ぼすことと考えられるのである。ここで言う「何らかの影響」とは、細胞膜に接着・吸着されたり、細胞膜内に取り込まれたりすることなどを意味している。そこで、人工的に作製した擬似細胞膜（人工膜）を電極などの表面に装着させることにより、擬似細胞膜への毒物の作用をリアルタイムで測定することが可能となるのである。すなわち、毒物との反応により変化する擬似細胞膜の物理情報（膜電位、電気容量、イオン透過性、発光、発熱・吸熱など）を測定し、毒物反応前後の出力値の差から毒物の混入が判定できるのである。では、毒物の種類や量はいったいどのようにして決定されるのであろうか？一般に細胞膜は、リン脂質を主成分とする脂質二分子膜に蛋白質や糖などの分子が取り込まれたり、表面に接着したりして構成されている。そこで擬似細胞膜は、脂質膜あるいはそれに代わる高分子膜をベースに、毒物と作用する各種の蛋白質や糖などの分子を配合することにより人工的に作製される

（なお、毒物の種類によっては脂質膜のみで応答を示す場合もあるので、毒物と作用する物質を添加することは本発明では必須条件ではない）。従って、用いる脂質や蛋白質・糖などの種類や量、更には擬似細胞膜の作製方法などを変化させることにより、各種の毒物センサを作ることが可能となる。そして、予め個々の毒物センサの毒物応答（毒物の種類と量に応じて出力値がどのように変化するか）を求めておき、これらの応答パターンを基に、実際の測定結果（複数のセンサからの出力値）から毒物の種類と量を決定するのである。

【0006】以上のようにして構成される毒物センサにおいては、ほぼリアルタイムで応答が得られる他、構成物が生物あるいは微生物ではないために餌を与えるようなメンテナンスは全く必要ない。また、定常状態からのズレを出力値として用いることにより、広範囲な環境条件でのセンサの使用を可能にしている。更に、各毒物センサからの出力値を無線で信号処理施設へ転送できるため、河川や海洋などでも自由に使用することができる。なお、測定感度を考慮すると擬似細胞膜としては脂質二分子膜が最適であることが本発明者らの検討により明らかになった。しかしながら、脂質二分子膜は物理的振動や静電気などの外力に対して不安定であり、その寿命も精々数日間程度であった。そこで、脂質二分子膜を利用

する毒物センサを実用化するにあたり、脂質二分子膜の破壊を自動的に検知し、即座に、膜形成場所に再現性良く脂質二分子膜を自動的に形成させるデバイスを考案するに至った。

【0007】

【発明の実施の形態】（実施例）以下、実施例を用いて詳細に本発明を説明する。

（実施例1）脂質二分子膜の作製

脂質二分子膜の作製方法（例）を以下に略述する。

【0008】適当な脂質溶液（例えばn-デカンを溶媒に使用、適当な毒物反応物質を含有していても良い）を作製し、緩衝液中で微小シリンジを用いて一定量をテフロン製の膜やテフロン被覆したニッケル基板（中央に直径1mm以下の孔が空いている）に注入する。そのまま放置すると、孔の部分に脂質二分子膜が自然に再構成され、同時に毒物反応物質（糖脂質など）もこの膜内に取り込まれる。

（実施例2）脂質二分子膜を用いる毒物センサ（手動による予備試験）

（1）試薬

トリオレイン（別名：グリセリル トリオレート、分子量：885、融点：4～5℃）及びトリクロロエチレン（通称：トリクレン）は、和光純薬工業社製を使用した。モノオレイン（別名：グリセリル モノオレート、分子量：357、融点：33～34℃）、n-デカン及びアセトニトリルは、関東化学社製を用いた。また、コレステロール（分子量：387、融点：149℃）はシグマ社製を使用した。その他、実験に使用した試薬は、全て市販特級品を特に精製せずにそのまま使用した。水は、イオン交換水を超純水製造装置（ミリボア社製、Milli-Q）を通して使用した。なお、脂質二分子膜を形成するために用いる、単一の穴を有するニッケル基板（孔径：0.2～0.6mm、厚さ：1.0mm）は、オプトニクス精密社製の特注品であり、表面をテフロン（登録商標）膜で被覆した後に、穴の部分を針で破壊して使用した。

（2）電極及び測定用セル

図1に、用いた測定装置の模式図を示した。石英ガラス製の測定用セル（各パートの容量は約25mL、自社製の特注品）10内にニッケル基板をシリコンパッキングを用いて配置し、基板に開けた穴に刷毛塗法により脂質二分子膜を作製した。刷毛塗法とは、脂質溶液を含ませた絵筆を用いて穴の中に脂質を入れ込み、自然放置することで二分子膜を作製する手法である（自然薄化法とも呼ばれる）。脂質二分子膜の作製状況は、キーエンス社製のデジタルマイクロスコープ（VH-6300）を用いて観察した。この膜を介して、測定極であるAg/AgCl電極（東亜電波社製、特注品）11を溶液内に挿入し、膜間の電位差（膜電位）をエレクトロメータ（アドバンテスト社、TR8411）12で計測した。デー

タは横河ヒューレットパッカード社製の記録計（Type：3047）13で記録した。なお測定用セル及び電極は、防振台上に乗せ、物理的な振動を防ぐと共に、全体を電氣的絶縁箱の中に入れて測定を行った。

（3）実験方法

表面をテフロン膜で被覆したニッケル基板を測定用セルにシリコン製パッキンを介してセットし、各パートにそれぞれ20mLの10mM食塩水溶液14を添加した後、膜電位（この状態では脂質膜は形成されていない）が安定するまで15分程度放置する。次に適当な脂質溶液を含ませた絵筆（作業をし易くするために先端を少し曲げてある）を用いて、ニッケル基板の穴の中に適量の脂質を入れ込む。脂質が穴に入ると膜抵抗が生じるため、急激に膜電位が変化する。その後静かに放置すると、膜電位が一定の値に落ち着き、脂質二分子膜が形成される。その後、10μLのトリクロロエチレンあるいはcis-1,2-ジクロロエチレン（各々アセトニトリル溶液）を右側のパートに、左側のパートには同量のアセトニトリルを添加した。なお、測定液の攪拌は行わなかった。これは、攪拌装置から出る電氣的ノイズ及び物理的振動の影響を懸念したためである。

（4）実験結果

図2にトリクロロエチレン（最終濃度：5ppm）の測定結果の一例を示す。本実験では脂質としてモノオレインのみを用い、測定は全て室温で行った。ニッケル基板の穴径は0.6mmであった。この結果から明らかなように、トリクロロエチレン溶液を添加すると、すぐに膜電位は減少し最小値に達した後、徐々に増加して一定の膜電位（初期の膜電位と比較すると約1mV変化）になることが分かる。この場合、繰り返しトリクロロエチレンを添加すると、添加の回数（トリクロロエチレン濃度の増大）に伴って平衡電位が少しずつ変化することも明らかになった。しかし4回目の添加では、殆ど膜電位の変化は観測されなかった（4回目添加後に膜が破壊）。なお、膜電位の絶対値の変化が重要であり、極性（+側あるいは-側）の変化は使用する電極の特性に依存するので、あまり重要ではないと考えられる。以上から、モノオレインという単一の脂質二分子膜で、トリクロロエチレンに対して膜電位応答を示すことが明らかになり、脂質二分子膜を利用する毒物バイオセンサの基本原理が確認できたと言える。しかしながら、脂質二分子膜の不安定性も再確認されたのである。

（実施例3）脂質二分子膜を用いる毒物センサ（自動脂質二分子膜作製デバイスの検討1）

自動二分子膜作製デバイスの模式図（例）を図3に示す。本例では、実施例2の刷毛塗法を自動化することを考えている。すなわち、一定量の脂質溶液を脂質膜を作製する穴に自動注入するのである（数マイクロレベル）。吐出部1にはマイクロポンプの適用を想定している。脂質溶液の注入のタイミングは、常時モニタしてい

る膜電位の消失時である。これは、脂質二分子膜2が破壊されると、膜電位が消失するからである。光学的な検出法に比べ、非常に簡便になる。脂質溶液が穴に注入されると、 $\pm 10 \text{ mV}$ 以上の膜電位が発生し、安定な二分子膜が形成されるに伴い、徐々に一定の電位に落ち着いてくる。実際の毒物測定は、膜電位が一定になってから実施される。貯留槽3には適当量の脂質溶液が貯えられている。4はコントローラ、5は Ag/AgCl 電極、6はテフロン皮膜ニッケル基板、7は液槽である。

(実施例4) 脂質二分子膜を用いる毒物センサ(自動脂質二分子膜作製デバイスの検討2)

実施例3の実施例において、吐出部をインクジェット方式(圧電素子利用)のポンプを採用したものである。マイクロポンプと比較して、小型で安価であることが特徴である。

(実施例5) 脂質二分子膜を用いる毒物センサ(実際の毒物測定結果)

実施例3の毒物センサデバイスを用いて、 cis -ジクロロエチレン(DCE)を測定した結果を図4に示す。本デバイスを使用して、 50 ppb オーダーでもDCEが測定できることが明らかになった。

[0009]

*

*【発明の効果】本発明のセンサデバイスを用いることにより、メンテナンスフリーで、かつリアルタイムな広範囲の毒物検出定量用のセンサを供給できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】測定装置の模式図。

【図2】 5 ppm (final) のトリクロロエチレン(TCE)を繰り返し添加した時の膜電位応答例(刷毛塗法適用、モノオレイン二分子膜使用)。

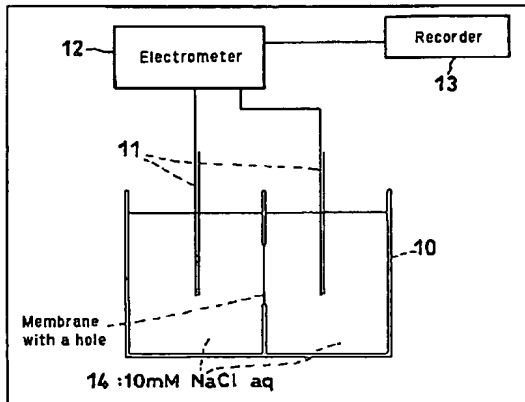
【図3】自動二分子膜作製デバイスの模式図(例)。

10 【図4】 50 ppb (最終濃度) cis -1, 2-ジクロロエチレン(DCE)を添加した時の膜電位応答例(モノオレイン/コレステロール二分子膜使用) [孔径: 0.2 mm 、自動脂質二分子膜デバイス使用]。

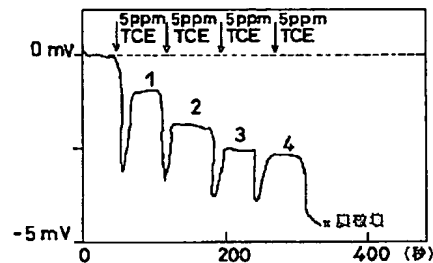
【符号の説明】

- 1 吐出部
- 2 脂質二分子膜
- 3 貯留槽
- 4 コントローラ
- 5 Ag/AgCl 電極
- 6 テフロン皮膜ニッケル基板
- 7 液槽

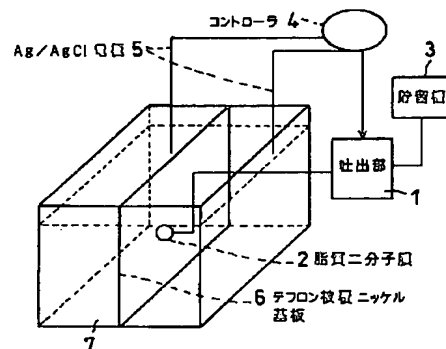
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

